

## **REMARKS**

### **STATUS OF CLAIMS**

Please amend Claims 17, 21 and 23-28. Additionally, please add new Claims 29-64. After entry of this amendment Claims 17-28 and 29-64 will be pending. Support for the claim amendments and new claims can be found throughout the specification and in the claims as originally filed. For example, support can be found, at least, at pages 2-5. No new matter has been added.

### **35 U.S.C. §112, SECOND PARAGRAPH REJECTIONS**

**Claims 23-28** stand rejected under 35 U.S.C. §112, second paragraph as allegedly being indefinite for inclusion of a broad range together with a narrow range that falls within the broad range in the same claim. It is noted that item 15 of the Office Action dated January 27, 2010 (at page 5) points out that the Applicants did not remark on this rejection of Claims 23-28 under 35 U.S.C. §112, second paragraph, which was originally presented in item 71 of the Office Action dated July 22, 2009 (at page 41). In response to this rejection, Applicants have amended Claims 23-28 to remove the narrow statement of the range previously recited therein. Namely, the phrases “in particular caused by...” and “in particular through...” have been removed along with the exemplary embodiments provided thereafter in Claims 23-28.

Additionally, **Claims 17-26** stand rejected under 35 U.S.C. §112, second paragraph as allegedly being indefinite with regard to the recitation of the phrase “an effective amount.” Applicants point out that this rejection of Claims 17-26 under 35 U.S.C. §112, second paragraph, was solely presented in item 71 (pages 40-41) of the Office Action dated July 22, 2009. In response to this rejection, Applicants have amended independent Claims 17 (from which Claims 18-20 depend) and independent Claim 21 (from which Claims 22-26 depend) to indicate that the effective amount of peptide administered is a therapeutically effective amount. As these claims are directed to methods for treating shock, Applicants argue that one skilled in the art could determine specific values for the amount required to practice the presently claimed invention.

In view of the aforementioned amendments, Applicants respectfully request withdrawal of these rejections under 35 U.S.C. §112, second paragraph.

### **35 U.S.C. §102 REJECTIONS**

**Claims 17-28** stand rejected under 35 U.S.C. §102(b) as allegedly being anticipated by **WO 02/48180** (Petzelbauer) published on Jun. 20, 2002. Additionally, **Claims 17-28** stand rejected under 35 U.S.C. §102(e) as allegedly being anticipated by **US 2004/0192596** (Petzelbauer) and **US 2007/0037749** (Petzelbauer).

Published patent applications US 2004/0192596, US 2007/0037749 and WO 02/48180 disclose specific peptides and their use in treating or preventing inflammation. In contrast, the presently claimed invention is directed to the treatment of shock. The Examiner alleges that, "Since the cause that leads to inflammation and shock is the same, the method of treating inflammation would necessarily treat shock, and vice versa." Applicants disagree. Although, shock may be the result of specific types of inflammation, not all cases of shock include inflammation as a symptom (*e.g.*, hypovolemic shock is due to loss of effective circulating blood volume). Thus, Applicants argue that methods of treating inflammation are distinct from methods of treating shock. Importantly, the disclosure of methods for treating or preventing inflammation in reference WO 02/48180 was found to not be of particular relevance to the determination of novelty and inventive step of methods for treating shock in the presently claimed invention.

In that regard, and in support of Applicants' position that the presently claimed invention is neither anticipated nor rendered obvious by the aforementioned published applications, Applicants provide the following evidence and arguments. Reference WO 02/48180 was cited in the International Search Report of International application PCT/AT2005/000228 which corresponds to the instant application. A copy of this International Search Report is enclosed herein as "**Appendix A.**" As reflected therein, reference WO 02/48180 was cited as an "A" category document. That is, a document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance. In contrast, a document of particular relevance is one that the claimed invention cannot be considered novel or involve an inventive step over (*i.e.*, when the document is taken alone (category “X”); or when the document is combined with one or more other such documents wherein such combination is obvious to a person skilled in the art (category “Y”)). Importantly, reference WO 02/48180 was found to not be of particular relevance to the determination of novelty and inventive step with regard to the subject matter presently claimed. Consequently, reference WO 02/48180 neither anticipates nor renders the presently claimed invention obvious.

Additionally, Applicants point out that reference WO 02/48180 was cited in European patent EP 1 691 827 corresponding to the instant application. A copy of European patent EP 1 691 827 is enclosed herein as “**Appendix B.**” *See* EP 1 691 827, front page. Notably, the pending claims of the instant application are of similar claim scope to those granted in EP 1 691 827. *See* EP 1 691 827, English language claim set. Reference WO 02/48180 was thus not considered by the European Patent Office to bar the patentability of the issued claims. Rather, the granted European claims satisfy the requirements for novelty and an inventive step over reference WO 02/48180. Applicants argue that in light of the similar claim scope of the granted European patent and the instantly claimed invention as well as the similar requirements for patentability in the U.S. and Europe, the disclosure of reference WO 02/48180 does not render the claims of the instant application novel or obvious.

Furthermore, Applicants point out the interrelationship of publications WO 02/48180, US 2004/0192596 and US 2007/0037749 cited against Claims 17-28 of the instant application.

- WO 02/48180 is the publication of International application PCT/AT2001/00387.
- US 2004/0192596 is the publication of U.S. application 10/459,030 (filed 6-11-2003) which is a continuation of International application PCT/AT2001/00387 (published as WO 02/48180).

- US 2007/0037749 is the publication of U.S. application 11/542,050 which is continuation of 10/459,030 (which is a continuation of International application PCT/AT2001/00387, published as WO 02/48180).

In short, **US 2004/0192596** and **US 2007/0037749** are published U.S. patent applications which are continuations of International application PCT/AT2001/00387, published as **WO 02/48180**. As reference WO 02/48180 was found to not be of particular relevance to the determination of novelty and inventive step with regard to the subject matter presently claimed, Applicants argue that the pending claims of the instant application are neither anticipated nor rendered obvious by **US 2004/0192596** or **US 2007/0037749**.

In light of the aforementioned remarks, Applicants respectfully request withdrawal of these rejections under 35 U.S.C. §102(b) and §102(e) of Claims 17-28.

### **DOUBLE PATENTING REJECTIONS**

**Claims 17-28** stand provisionally rejected under the judicially created doctrine of obviousness-type double patenting as allegedly being unpatentable over Claims 1-4 of U.S. Patent No. **7,271,144**.

**Claims 17-28** stand provisionally rejected under the judicially created doctrine of obviousness-type double patenting as allegedly being unpatentable over Claims 1-3 of U.S. Patent No. **7,494,973**.

**Claims 17-28** stand provisionally rejected under the judicially created doctrine of obviousness-type double patenting as allegedly being unpatentable over Claims 1-4 of copending Application No. **11/899,611**.

**Claims 17-28** stand provisionally rejected under the judicially created doctrine of obviousness-type double patenting as allegedly being unpatentable over Claims 6-7 of copending Application No. **12/121,533**.

**Claims 17-28** stand provisionally rejected under the judicially created doctrine of obviousness-type double patenting as allegedly being unpatentable over Claims 6-7 of copending Application No. **12/121,544**.

**Claims 17-28** stand provisionally rejected under the judicially created doctrine of obviousness-type double patenting as allegedly being unpatentable over Claims 1-2 and 4-5 of copending Application No. **12/158,670**.

Applicants point out the interrelationship of the aforementioned U.S. patents and one of the U.S. applications cited against the claims of the instant application under double patenting grounds as well as the corresponding publications cited against the claims of the instant application under 35 U.S.C. §102.

- U.S. application 10/459,030 (filed 6-11-2003), published as **US 2004/0192596**, granted as U.S. patent **7,271,144**
- U.S. application 11/542,050 (filed 10-3-2006), published as **US 2007/0037749**, (which is a continuation of U.S. application 10/459,030) granted as U.S. patent **7,494,973**.
- U.S. application **11/899,611** is a divisional of U.S. application 10/459,030.

In short, U.S. patent 7,271,144 (corresponding to US 2004/0192596), U.S. patent 7,494,973 (corresponding to US 2007/0037749) and U.S. application 11/899,611 share the same disclosure.

Applicants argue that methods of treating shock disclosed in the instant application are neither anticipated nor rendered obvious by methods of treating inflammation disclosed in U.S. patent 7,271,144, U.S. patent 7,494,973 and U.S. application 11/899,611. Consequently, Applicants

Application No.: 10/596,103  
Amendment and Response dated May 27, 2010  
Reply to Office Action of January 27, 2010  
Docket No.: 1848-7 PCT/US/RCE  
Page 15

respectfully request withdrawal of the double patenting rejections of Claims 17-28 in view of U.S. patent 7,271,144, U.S. patent 7,494,973 and U.S. application 11/899,611.

With regard to the remaining double patenting rejections in view of U.S. applications 12/121,533, 12/121,544 and 12/158,670, Applicants respectfully request an *Ex parte Quayle* action to address these matters once prosecution on the merits is closed. At that time Applicants will consider the need to file one or more terminal disclaimers over the aforementioned patent applications.

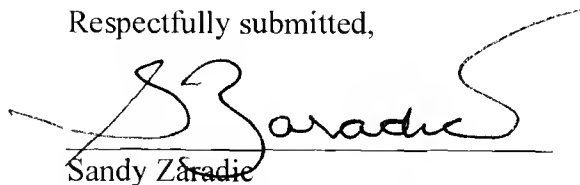
#### **OBJECTIONS**

**Claim 17** is objected to for lacking a sequence identifier for the peptide sequence cited therein. In light of the amendment to Claim 17 to recite a sequence identifier for the peptide sequence cited therein, this objection is no longer applicable.

#### **CONCLUSION**

Applicants believe Claims 17-28 and 29-64 are in condition for allowance and respectfully request the same. If there are any questions or if additional information is required, the Examiner is respectfully requested to contact Applicants' attorney at the number listed below.

Respectfully submitted,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Zaradic', is written over a horizontal line.

Sandy Zaradic  
Registration No.: 45,997  
Attorney for Applicants

HOFFMANN & BARON, LLP  
6900 Jericho Turnpike  
Syosset, New York 11791  
(973) 331-1700

Application No.: 10/596,103  
Amendment and Response dated May 27, 2010  
Reply to Office Action of January 27, 2010  
Docket No.: 1848-7 PCT/US/RCE

## **APPENDIX A**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/AT2005/000228

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K38/36 A61P7/00 A61P9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/02565 A (THERASORB MEDIZINISCHE SYSTEME GMBH) 21 January 1999 (1999-01-21)	1-4, 9
A	the whole document siehe insbesondere: page 4, line 14 - page 6, line 8 page 7, line 1 - line 24 -----	5-8
A	WO 02/48180 A (FIBREX MEDICAL RESEARCH & DEVELOPMENT GMBH) 20 June 2002 (2002-06-20) cited in the application the whole document siehe insbesondere: page 2, line 1 - page 3, line 29 page 5, line 17 - page 6, line 14 page 17 - page 19; examples 13,14 ----- -/--	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 October 2005

Date of mailing of the international search report

07/11/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuchs, U



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/AT2005/000228

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 2003, ZACHAROWSKI, K. ET AL.: "A small molecule derived from fibrinogen, Bbeta15-42, reduces myocardial inflammation and injury via inhibition of the adhesion molecule VE-cadherin" XP002350542 Database accession no. 2004:19507 the whole document</p>	1-9
A	<p>KNÖBL, P.: "Pathophysiologie und Therapie von Sepsis-assoziierten Gerinnungsstörungen" WIENER MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT, vol. 152, no. 21-22, 2002, pages 559-563, XP002350540 the whole document</p>	1-9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT2005/000228

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9902565	A	21-01-1999	AU 732424 B2 26-04-2001
			AU 8854998 A 08-02-1999
			CA 2295688 A1 21-01-1999
			DE 19729591 A1 11-02-1999
			EP 1003787 A2 31-05-2000
			JP 2001509517 T 24-07-2001
			NZ 502749 A 31-08-2001
			TR 200000954 T2 21-07-2000
WO 0248180	A	20-06-2002	AU 2131602 A 24-06-2002
			BG 107891 A 31-08-2004
			BR 0116122 A 14-10-2003
			CA 2430972 A1 20-06-2002
			CN 1518558 A 04-08-2004
			CZ 20031630 A3 15-10-2003
			EA 5576 B1 28-04-2005
			EE 200300283 A 15-10-2003
			EP 1341819 A2 10-09-2003
			HR 20030564 A2 30-06-2005
			HU 0401536 A2 29-11-2004
			JP 2004527469 T 09-09-2004
			NO 20032656 A 12-06-2003
			PL 362924 A1 02-11-2004
			SK 7062003 A3 04-11-2003
			US 2004192596 A1 30-09-2004
			ZA 200304545 A 13-09-2004

Application No.: 10/596,103  
Amendment and Response dated May 27, 2010  
Reply to Office Action of January 27, 2010  
Docket No.: 1848-7 PCT/US/RCE

## **APPENDIX B**



(11) **EP 1 691 827 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des  
Hinweises auf die Patenterteilung:  
**19.08.2009 Patentblatt 2009/34**

(51) Int Cl.:  
**A61K 38/36 (2006.01) A61P 7/00 (2006.01)**  
**A61P 9/00 (2006.01)**

(21) Anmeldenummer: **05752350.8**

(86) Internationale Anmeldenummer:  
**PCT/AT2005/000228**

(22) Anmeldetag: **24.06.2005**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:  
**WO 2006/000007 (05.01.2006 Gazette 2006/01)**

(54) **VERWENDUNG VON PEPTIDEN, DIE AUS DER B BETA KETTE DES HUMANEN FIBRINOGENS  
ABGELEITET WURDEN, ZUR BEHANDLUNG VON SCHOCK**

USE OF PEPTIDES DERIVED FROM THE B BETA CHAIN OF HUMAN FIBRINOGEN FOR THE  
TREATMENT OF SHOCK

UTILISATION DES PEPTIDES DERIVES DE LA CHAÎNE B BETA DU FIBRINOGENE HUMAINE  
POUR LE TRAITEMENT DU CHOC

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR  
HU IE IS IT LI LT LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL BA HR LV MK YU**

(74) Vertreter: **Schwarz, Albin**  
**Kopecky & Schwarz**  
Patentanwälte  
**Wipplingerstraße 30**  
**1010 Wien (AT)**

(30) Priorität: **25.06.2004 AT 10872004**  
**13.01.2005 AT 402005**

(56) Entgegenhaltungen:  
**WO-A-02/48180 WO-A-99/02565**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**23.08.2006 Patentblatt 2006/34**

(73) Patentinhaber: **Fibrex Medical Research &  
Development GmbH**  
**1010 Wien (AT)**

(72) Erfinder:  
• **PETZELBAUER, Peter**  
**A-1230 Wien (AT)**  
• **ZACHAROWSKI, Kai**  
**40593 Düsseldorf (DE)**

- **DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES  
INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA,  
US; 2003, ZACHAROWSKI, K. ET AL.: "A small  
molecule derived from fibrinogen, Bbeta15-42,  
reduces myocardial inflammation and injury via  
inhibition of the adhesion molecule VE-cadherin"**  
**XP002350542 Database accession no. 2004:  
19507**
- **KNÖBL, P.: "Pathophysiologie und Therapie von  
Sepsis-assoziierten Gerinnungsstörungen"**  
**WIENER MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT, Bd.  
152, Nr. 21-22, 2002, Seiten 559-563, XP002350540**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

**EP 1 691 827 B1**

**Beschreibung**Hintergrund der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung ist auf eine pharmazeutische Zubereitung zur Behandlung von Schock gerichtet.

**[0002]** Ein Schock ist eine akute Komplikation vieler verschiedener pathologischer Zustände, die durch die Unfähigkeit des Herz-Kreislauf-Systems, einen ausreichenden Durchblutungsdruck aufrechtzuerhalten, gekennzeichnet ist. Infektionserreger können direkt oder indirekt ein Versagen des Herz-Kreislauf-Systems bewirken. Bakterien, Bakteriengifte, Viren und nicht zuletzt eine unzureichende zelluläre oder humorale Wirtsreaktion, einhergehend mit einer Entzündung und Gerinnung, können zu einem Verlust an Gefäßtonus, einem Verlust an Gefäßbarrierefunktion, einem Verlust an myokardialer Kontraktionskraft und einem Verlust an Organfunktion führen, was alleine oder in Kombination zu einem Schock und schließlich zum Tod des Patienten führt. Die Behandlung einer bakteriellen Infektion beruht auf einer antibiotischen Behandlung, welche die Bakterien abtötet, jedoch die Toxinämie nicht behandelt und die unzureichende zelluläre oder humorale Reaktion nicht korrigiert. Bei gramnegativen Bakterien ist Lipopolysaccharid (LPS oder Endotoxin) für das Auslösen eines gramnegativen Schocks verantwortlich. Grampositive Bakterien können ein multiples Organversagen und einen septischen Schock ohne Endotoxämie verursachen, die Zellwand von grampositiven Bakterien enthält jedoch ebenfalls Toxine wie Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykan (PepG). LTA und PepG wirken in Synergie, um Cytokine, wie z.B. den Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$  und Interferon (IFN)  $\gamma$ , freizusetzen, und zwar um iNOS zu induzieren und schließlich Schock und Organversagen zu verursachen.

**[0003]** Endotoxämie, Sepsis und septischer Schock stehen mit der Erzeugung großer Mengen von Stickstoffdioxid (NO) in Zusammenhang. Die übermäßige Gefäßerweiterung und vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber blutdruckerhöhenden Mitteln, welche mit einem Kreislaufschock einhergehen, können mit Inhibitoren der induzierbaren Isoform der NO-Synthase (iNOS) rückgängig gemacht werden (Southan und Szabo, Biochem Pharmacol. 1996;51:383-94, Thiemermann Gen Pharmacol 1997; 29:159-66), iNOS-Inhibitoren reduzieren jedoch nicht die von Toxinen verursachte Organschädigung (Wray et al. Shock 1998;9:329-335).

**[0004]** Die Behandlung eines durch Virusinfektionen verursachten Schocks ist eine sogar noch größere Herausforderung, da für die meisten Infektionen keine Antivirussmittel verfügbar sind. Behandlungen, die allein auf die Beseitigung des Infektionserregers abzielen, sind bei Patienten mit einem Schock aufgrund eines Infektionserregers nicht ausreichend, da vom Infektionserreger ausgelöste sekundäre Vorgänge, welche mit einer Entzündungsreaktion und Veränderungen des Gerinnungssystems einhergehen, möglicherweise unabhängig wurden und zum Tod des Patienten führen, ungeachtet der Frage, ob der ursächliche Infektionserreger neutralisiert wurde oder nicht. Eine spezifische Behandlung ist nicht verfügbar, und somit zielen derzeitige Verfahren darauf ab, die Symptome zu lindern, was eine mechanische Ventilation, den Ersatz von Flüssigkeit, die Anwendung herzwirksamer Arzneimittel, die strenge Kontrolle der Sauerstoffsättigung, des Hämoglobins, der Glucose und der Nierenfunktion einschließt. Die alleinige Kontrolle der Entzündungsreaktion, z.B. mittels hoch dosierter Steroide, oder die Hemmung der Gerinnung mit Antithrombin bringt keine Verbesserung der Überlebensrate. Das einzige Molekül, bei dem sich bisher erwies, dass es hinsichtlich der Verringerung der Mortalität eine bemerkenswerte Wirksamkeit besitzt, ist das „aktivierte Protein C“, welches mit Koagulation/Fibrinolyse und den Entzündungsprozessen wechselwirkt.

**[0005]** Ein Schock während des Verlaufs einer Infektion hängt zumeist mit offensichtlichen oder nicht offensichtlichen Veränderungen des Plasmafibrinogens zusammen, begleitet von einer Fibrinbildung und einem Anstieg der Fibrinfragmente. Diese Aktivierung von Gerinnung und fibrinolytischen Pfaden kann zu einer offensichtlichen oder nicht offensichtlichen disseminierten intravaskulären Koagulation (DIC) führen, welche einen Gefäßverschluss und Endorganschaden zur Folge hat, und zu einem Verbrauch an Gerinnungsfaktoren, der Blutungen zur Folge hat. Eine Sepsis ist die häufigste Ursache einer DIC. Wichtig ist, dass Fibrinogen, Fibrin und Fibrinfragmente nicht nur bei der Blutgerinnung eine Rolle spielen, sondern mehrere Bindungsstellen für Zell- und Matrixproteine aufweisen, welche ihnen das Wechselwirken mit weißen Blutkörperchen, Blutplättchen, Endothelzellen und Matrixstrukturen ermöglichen. Dies führt zur Zellaktivierung, Zellwanderung, einem Freisetzen von Cytokinen und letztendlich zu einer Entzündungsreaktion. Die Rolle, die Fibrinogen oder Fibrin bei der Entzündung spielt, ist umfassend dokumentiert (besprochen von Altieri Thromb Haemost 82:781-786; Herrick et al. Inf J Biochem Cell Biol 31:741-46). Der D-Bereich des Moleküls enthält zahlreiche Bindungsstellen für Matrixmoleküle, Endothelzellen, Blutplättchen und Entzündungszellen. Der E-Bereich des Fibrins bindet an CD11c (Loike et al. Proc Natl Acad Sci USA 88:1044-48).

**[0006]** Vor kurzem beschrieben wir eine neue Rolle für die Bbeta<sub>15-42</sub>-Sequenz des Fibrins bei der Entzündung (WO 02/48180). Diese Sequenz ist ebenfalls im E-Bereich des Fibrins lokalisiert und ist nur dann aktiv, wenn Fibrinopeptid gespalten wird. Fibrinfragmente, welche diese Sequenz an ihrem freien N-Terminus der beta-Kette enthalten, binden an das Endothelium und verursachen eine Entzündung, und ein Peptid, das mit den Aminosäuren 15-42 der Bbeta-Kette des Fibrins zusammenpasst, blockiert die Bindung von Fibrinfragmenten an die Endotheloberflächen und blockiert in vitro die Entzündung (WO 02/48180). In vivo verhindert dieses Peptid eine myokardiale Entzündung und verringert die Ausmaße eines Myocardinfarkts in Situationen der Ischämie / Reperfusion (WO 02/48180).

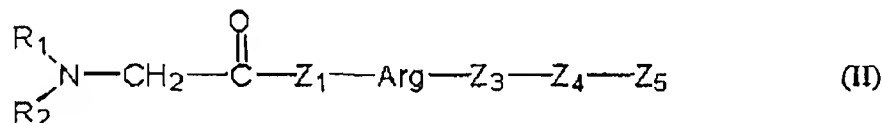
[0007] Fibrinfragmente treten in jedweder Situation mit beeinträchtigter Fibrinbildung und beeinträchtigter Fibrinolyse auf. Besonders in Situationen des Schocks aufgrund eines Infektionserregers stellen diese veränderte Fibrinbildung und diese veränderte Fibrinolyse ein großes Problem dar. Bei zahlreichen Erkrankungen wurde eine direkte Wechselbeziehung zwischen dem Resultat und der Beeinträchtigung der Fibrinbildung / Fibrinolyse dokumentiert. Z.B. Dengue (van Gorp et al. J Med Virol 2002, 67:549-54, Mairuhu et al. Lancet Inf Dis 2003; 3:33-41). In WO 99/02565 ist die Verwendung eines Liganden für Fibrinogen und/oder Fibrin zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Mikrozirkulationsstörungen und/oder zur Beeinflussung der Rheologie eines Säugers geoffenbart. Das Atemnotsyndrom beim Erwachsenen (ARDS) ist eine Form einer akuten Lungenschädigung, die durch eine rötliche extravaskuläre Fibrin-ablagerung gekennzeichnet ist (Idell Am J Respir Med. 2002; 1:383-91). Eine Thrombose in den pulmonalen Gefäßen und eine disseminierte intravaskuläre Koagulation wurden im Zusammenhang mit ARDS ebenfalls beobachtet.

[0008] Die Gründe für das Fortbestehen/weltweite Auftreten von Dengue-Fieber (DF) und hämorrhagischem Dengue-Fieber (DHF) als großem Problem der Volksgesundheit sind komplex, Vektorkontrollmaßnahmen waren nicht erfolgreich, um DF/DHF auszumerzen. Derzeit liegt der Hauptschwerpunkt der Finanzierungsmittel am öffentlichen Sektor für die Dengue-Forschung (im Jahr 2001 auf 15 Millionen US\$ geschätzt) bei der Molekularepidemiologie, der Immunpathophysiologie, der Forschung zur Entdeckung von Impfstoffen der zweiten Generation und bei neuen oder verbesserten Ansätzen zur Vektorkontrolle.

[0009] Mehrere Impfstoffkandidaten befinden sich in den USA und in Thailand im klinischen Versuchsstadium, am Markt gibt es jedoch noch immer kein Arzneimittel zur Behandlung infizierter Patienten und, was noch schlimmer ist, scheinen derzeit keinerlei kommerziellen Aktivitäten zur Erforschung und Entwicklung einer Chemotherapie im Gange zu sein. Die Weltgesundheitsorganisation veröffentlichte strategische Richtlinien zur Bekämpfung von DF/DHF, welche - als Ziele von hoher Priorität - die Entwicklung von Antivirussmitteln, die auf Protease oder andere kaum untersuchte Enzyme gerichtet sind; die Entwicklung von Antivermittlern, die auf die Ursachen einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit oder geänderten Hämostase gerichtet sind, umfassen.

#### Kurzfassung der Erfindung

[0010] Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Peptids mit der allgemeinen Formel II



worin

$R_1$  und  $R_2$  gleich oder unterschiedlich, Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 10, insbesondere 1 bis 3 Kohlenstoffatomen bedeuten,

$Z_1$  einen Histidinrest bedeutet,

Arg einen Argininrest bedeutet,

$Z_3$  einen Prolin- oder Valinrest bedeutet,

$Z_4$  einen Leucin- oder Valinrest bedeutet,

$Z_5$  ein von der Bbeta-Kette des Fibrins abgeleiteter Peptidrest ist,

welches Peptid die biologische Eigenschaft besitzt, mit dem induzierbaren VE-Cadherin-Bindungsmotiv an der B $\beta$ -Kette (d.h. B $\beta$ <sub>15-42</sub>) des menschlichen Fibrins zusammenzupassen, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Behandlung von Schock.

Überdies wird bevorzugt verwendet ein Peptid, in welchem

$Z_5$  ein Peptidrest mit der Aminosäuresequenz

Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg

$Z_1$  ein Histidinrest,

Arg ein Argininrest,

$Z_3$  ein Prolinrest, und

$Z_4$  ein Leucinrest ist.

[0011] Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines Peptids, welches die N-terminale Sequenz

**Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-  
-Pro-Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg**

5

aufweist und welches die biologische Eigenschaft besitzt, mit dem induzierbaren VE-Cadherin-Bindungsmotiv an der B $\beta$ -Kette (d.h. B $\beta$ <sub>15-42</sub>) des menschlichen Fibrins zusammenzupassen, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Behandlung von Schock.

10 Eine weitere bevorzugte Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verwendung ist dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid

**Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-  
-Pro-Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg**

15

ist.

20 Es hat sich gezeigt, daß mit den oben genannten Peptiden insbesondere Schockzustände behandelt werden können, wobei der Schock mit einem oder mehreren aus der Gruppe, umfassend Bakteriengifte, disseminierte intravaskuläre Koagulopathie, nekrotisierende Fasciitis, hämorrhagischen Schock infolge einer Virusinfektion, insbesondere verursacht durch Filovirus, Arenaviridae, Bunyaviridae, Flavivirus, Dengue, akutes hämorrhagisches Atmungsversagen, verursacht durch Infektions-erreger oder Autoimmunerkrankungen, Organversagen nach einer Organschädigung, insbesondere durch einen Myocardinfarkt, eine Gefäßoperation, ein Abklemmen von Organen, einen hämorrhagischen Schock, Lungeninfarkt, Leberinfarkt, Darminfarkt, operative Eingriffe und Schlaganfall, und die Organfehlfunktion bei transplantierten Organen, in Zusammenhang steht.

25

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

30

Peptide und Proteine

35

**[0012]** Peptide wurden durch eine Festphasen-Peptidsynthese hergestellt und mittels einer Umkehrphasen-HPLC gereinigt, wobei Nucleosil 100-10C18-Säulen (PiChem, Graz, Österreich) verwendet wurden. Es sollte angemerkt werden, dass der beta 15-42-Bereich unter Spezies 100% gleichartig ist, wenn konservative Aminosäure-Substitutionen ermöglicht werden. Der aus den Aminosäuren A $\alpha$ 1-51, B $\beta$ 1-118 und  $\gamma$ 1-78 zusammen-gesetzte N-terminale Disulfidknoten von Fibrinogen (NDSK) wurde wie zuvor beschrieben hergestellt (WO 02/48180). Der aus den Aminosäuren A $\alpha$ 17-51, B $\beta$ 15-118 und  $\gamma$ 1-78 zusammengesetzte N-terminale Disulfidknoten von Fibrin (NDSK-II, dem die Fibrino-peptide A und B fehlen) wurde hergestellt, indem NDSK bei 37 °C 3 Stunden lang mit Thrombin (20 U / 1mg NDSK) behandelt wurde. Das restliche Thrombin wurde bei 37 °C 2 Stunden lang mit 10 mM Diisopropylfluorophosphat (Fluka, Milwaukee, WI) neutralisiert. Alle Produkte wurden daraufhin in eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) dialysiert.

40

ELISA

45

Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> bindet an VE-Cadherin

50

**[0013]** Die Wechselwirkung der Bbeta-Kette (Bbeta<sub>15-42</sub>) von Fibrin mit Endothelzellen verursacht morphologische Veränderungen (Bunce et al. J Clin Invest 89:842-50; Bach et al. Exp Cell Res 238:324-34; Chalupowicz et al. J Cell Biol 130:207-15; Hamaguchi et al. Blood 81:2348-56; Francis et al. Blood cells 19:291-306), eine Proliferation (Sporn et al. Blood 86:1802-10), das Freisetzen von von-Willebrand-Faktor (Ribes et al. J Clin Invest 79:117-23, Ribes et al. J Clin Invest 84: 435-42; Erban und Wagner, J Biol Chem 267, 2451-58) und möglicherweise IL-8 (Qi et al. Blood 90: 3593-3602) und eine Membranexpression von CD54 (Harley et al. Art Thromb Vasc Biol 20:652-658). VE-Cadherin wurde als Bindungsligand der Sequenz Bbeta<sub>15-42</sub> identifiziert und ELISAs wurden entwickelt, um diese Wechselwirkung von Endothelzellen und/oder VE-Cadherin mit Fibrin oder Fibrin-fragmenten nachzuweisen. Martinez et al. verwendeten anti-Pan-Cadherin-Antikörper zum Einfangen von Cadherinen aus Endothelzellen, gefolgt von einer Inkubation mit Fibrin (Martinez et al. Ann NY Acad Sci 936:386-405), HUVEC-Monoschichten (welche VE-Cadherin exprimieren) wurden mit radiomarkierten Fibrinfragmenten oder Peptid Bbeta<sub>15-42</sub> überschichtet (Bach et al. J Biol Chem 273:30719-28; Harley et al. Art Thromb Vasc Biol 20:652-658), und von Gorlatov und Medved wurde rekombinantes VE-Cadherin verwendet

55

(Biochemistry 41:4107-16). Andere setzten zum Nachweisen von Fibrinfragmenten im Blut einen ELISA ein, wobei sie hauptsächlich Antikörper gegen verschiedene Sequenzen innerhalb des Fibrinogenmoleküls verwendeten, einschließlich Antikörpern gegen das B $\beta$ <sub>15-42</sub>-Motiv (besprochen bei Fareed et al. Clin Chem 8:1845-53).

**[0014]** Wir entwickelten einen modifizierten ELISA, der mit denselben, von anderen beschriebenen Prinzipien arbeitet, der Zweck des hier beschriebenen ELISA besteht jedoch nicht darin, Fibrin-Abbauprodukte quantitativ zu bestimmen, sondern nach Proteinen, Peptiden oder Verbindungen zu suchen, welche die Bindung der B $\beta$ <sub>15-42</sub>-Sequenz und des VE-Cadherins stören. Das Prinzip besteht darin, dass das VE-Cadherin entweder als verkürztes Protein, als Vollprotein oder gekoppelt mit anderen Proteinen, welche die B $\beta$ <sub>1542</sub>-Bindungsstelle nicht stören, mit der B $\beta$ <sub>15-42</sub>-Sequenz von Fibrin wechselwirken darf. Man kann jegliche andere zusätzliche Substanz in dieses System einbringen und messen, ob diese Substanz die VE-Cadherin/B $\beta$ <sub>15-42</sub>-Bindung hemmt.

**[0015]** Im Einzelnen wurden 96-Mulden-Proteinimmobilisierungsplatten (Exiqon, Vedbaek, DK) mit rekombinantem menschlichem VE-Cadherin-FC-Fusionsprotein (8 nM; R&D Systems, Minneapolis) in PBS beschichtet und über Nacht bei 4 °C stehengelassen. Die Platten wurden danach gewaschen und mit Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> (GHRPLDKKREEAPSLRPAPP-PISGGGYR), das am C-Terminus des Peptids mit einer FLAG-Sequenz (DYKDDDDK) markiert war, oder mit einem FLAG-markierten Zufallspeptid (DRGAPAHPPRGPISGRSTPEKEKLLPG) inkubiert, und zwar in einer Konzentration von 0-80  $\mu$ Mol. Nach dem Waschen wurde durch Inkubation mit einem Peroxidase-markierten anti-FLAG-Antikörper (Sigma, St. Louis, USA) und einem chromogenen Substrat gebundenes FLAG-markiertes Peptid nachgewiesen. Die optische Dichte wurde durch einen auf eine Wellenlänge von 450 nm eingestellten ELISA-Plattenleser bestimmt. Die Daten stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen dar, wobei jeder dreifach durchgeführt wurde. Die untenstehende Tabelle zeigt, dass das Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> in konzentrationsabhängiger Weise an VE-Cadherin band. Im Gegensatz dazu zeigte das Zufallspeptid nur eine unwesentliche Bindung.

Dosisabhängige Bindung von Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> an VE-Cadherin

$\mu$ M		0	0,23	0,7	2,3	7	14	21	35	46	70
15-42 FLAG	Mittelwert	0	0,01	0,02	0,08	0,33	0,92	1,3	1,5	1,93	2,1
	Standardabweichung	0	0,01	0,01	0,03	0,17	0,19	0,2	0	0	0
Zufalls-FLAG	Mittelwert	0	0,01	0	0,01	0,03	0,12	0,2		0,35	0,5
	Standardabweichung	0	0,01	0	0,01	0,02	0,04	0,1		0	0

**[0016]** Das Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> und Fibrinfragmente konkurrieren hinsichtlich der Bindung an VE-Cadherin.

**[0017]** In einem nächsten Schritt analysierten wir, ob dieser ELISA zum Screenen nach anderen Peptiden/Verbindungen angewandt werden kann, damit diese mit der Bindung der B $\beta$ <sub>15-42</sub>-Sequenz an VE-Cadherin konkurrieren. Erwartungsgemäß hemmte das Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> vollständig die Bindung des flag-markierten Peptids B $\beta$ <sub>15-42</sub> und wurde als positive Kontrolle verwendet, und Zufallspeptide oder ein Lösungsmittel hatten keinerlei Wirkung und wurden als negative Kontrollen verwendet. Kürzere Peptide hemmten teilweise die Bindung von B $\beta$ <sub>1542</sub> an VE-Cadherin. NDSK-II hemmte die B $\beta$ <sub>15-42</sub>-Bindung in konzentrationsabhängiger Weise. Ein Gleichgewicht zwischen B $\beta$ <sub>15-42</sub> und NDSK-II (50%ige Hemmung) war bei einem Molverhältnis von 24:1 erreicht. NDSK hatte wenig oder keine Wirkung.

**[0018]** Die Kunststoffoberfläche wurde mit VE-Cadherin in einer Konzentration von 8 nM beschichtet. Danach wurden die angegebenen Peptide in Konzentrationen von 200  $\mu$ M hinzugefügt, NDSK oder NDSK-II wurde in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Der Nachweis der Bindung des FLAG-markierten B $\beta$ <sub>15-42</sub> (12  $\mu$ M) wurde wie obenstehend beschrieben durchgeführt.

Blockierendes Reagens	% Hemmung der 15-42FLAG-Bindung an VE-Cadherin Mittelwert $\pm$ Standardabweichung
Peptid 15-42 (28mer)	100 $\pm$ 10
Peptid zufällig (4mer)	3 $\pm$ 3
Peptid zufällig (28mer)	10 $\pm$ 3
Lösungsmittel	0 $\pm$ 0
Peptid 15-18 (4mer) 200 $\mu$ M	65 $\pm$ 12
Peptid 15-26 (12mer) 200 $\mu$ M	64 $\pm$ 10
Peptid 15-30 (16mer) 200 $\mu$ M	61 $\pm$ 13
Peptid 15-34 (20mer) 200 $\mu$ M	67 $\pm$ 17



(fortgesetzt)

	Blockierendes Reagens	% Hemmung der 15-42FLAG-Bindung an VE-Cadherin Mittelwert $\pm$ Standardabweichung
5	Peptid 15-37 (24mer) 200 $\mu$ M	17 $\pm$ 19
	Peptid 16-42 (27mer) 200 $\mu$ M	55 $\pm$ 13
	Peptid 15-18 (4mer) 12 $\mu$ M	7 $\pm$ 2
10	Peptid 15-26 (12mer) 12 $\mu$ M	6 $\pm$ 1
	Peptid 15-30 (16mer) 12 $\mu$ M	6 $\pm$ 3
	Peptid 15-34 (20mer) 12 $\mu$ M	7 $\pm$ 1
	Peptid 15-37 (24mer) 12 $\mu$ M	7 $\pm$ 2
	Peptid 16-42 (27mer) 12 $\mu$ M	5 $\pm$ 2
15	NDSK-II 0,06 $\mu$ M	1 + 0
	NDSK-II 0,12 $\mu$ M	39 + 18
	NDSK-II 0,20 $\mu$ M	42+14
20	NDSK-II 0,60 $\mu$ M	52 + 16
	NDSK-II 1,2 $\mu$ M	63+13
	NDSK-II 2,4 $\mu$ M	79+9
	NDSK-II 4,0 $\mu$ M	82 + 12
25	NDSK 0,06 $\mu$ M	0 + 0
	NDSK 0,12 $\mu$ M	2 + 1
	NDSK 0,20 $\mu$ M	1 + 1
	NDSK 0,60 $\mu$ M	7 + 6
	NDSK 1,2 $\mu$ M	15 + 13
30	NDSK 2,4 $\mu$ M	16 + 9
	NDSK 4,0 $\mu$ M	20 + 10
	anti-VE-Cadherin Ab (TEA1/31, 1 mg/ml)	2 + 1

**[0019]** Wirksamkeit des Peptids bbeta<sub>15-42</sub> bei der Behandlung von Denguevirus-infizierten Mäusen. Materialien und Methoden.

**[0020]** Virus. Das Denguevirus des Typs 2 (DEN-2), Stamm P23085, wurde von der Staatlichen Virensammlung, Moskau, Russland, in Form einer gefriergetrockneten Suspension von infiziertem ICR-Mäusegehirn erhalten. Das erhaltene Denguevirus wurde im Gehirn der ICR-Mäusejungtieren Passagen unterzogen, so wie zuvor beschrieben (At-rasheuskaya et al. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 35, 33-423). Eine 10%ige Gehirnsuspension diente als Virusstamm und wurde bei -40° C gelagert. Der Virustiter wurde durch die serienmäßigen Verdünnungen der Gehirnsuspension bestimmt. Die Gehirnsuspension wurde in Gruppen von jeweils 10 Mäusen (4 Wochen alte BALB/c) i.p. geimpft, und die Mortalität wurde aufgezeichnet. Der Virustiter wurde berechnet und betrug 7,4 1g LD50/ml.

Jegliche Arbeit mit dem infektiösen Virus wurde im Sicherheitsraum der höchsten Biosicherheitsstufe 3 (BSL-3) im Labor des SRC VB «Vector» (Russland) durchgeführt. Tiere.

**[0021]** Vier Wochen alte, durch Inzucht erzeugte männliche BALB/c-Mäuse (Haplotyp H-2d) wurden vom Vivarium des Staatlichen Forschungszentrums für Virologie und Biotechnologie «Vector» erhalten. Die Tiere wurden mit Futter und Wasser, das ad libitum verfügbar war, in einzelne Käfige gegeben. Analysen.

**[0022]** Den Mäusen wurde vor der Infektion und nach der Exposition an DEN-2 unter Methoxyfluran-Anästhesie aus dem orbitalen Sinus Blut entnommen. Für jeden Zeitpunkt wurden drei Mäuse zur Blutgewinnung herangezogen.

**[0023]** Die zirkulierenden Blutplättchen (PLT), roten Blutkörperchen (RBC), weißen Blutkörperchen (WBC), Hämoglobin (HGB) und Hämatokrit (HCT) wurden unter Verwendung eines Cell-Dyn 900-Hämatologie-Analysators (Sequoia-Turner corporation, USA, CA) bestimmt.

Ein Teil des gewonnenen Blutes wurde zentrifugiert, um Serum zu erhalten, das bis zum Ende des Versuchs bei -80°C gelagert wurde. Die Serumspiegel von Cytokinen wurden gemessen, wobei von R&D Systems (Minneapolis, USA) hergestellte Enzym-Immunoassay-Kits gemäß den Instruktionen des Herstellers verwendet wurden. Die Nachweisgrenzen waren wie folgt: TNF- $\alpha$ , weniger 5,1 pg/ml; Interleukin (IL)-1 $\beta$ , 3,0 pg/ml; IL-6, 3,1 pg/ml; IFN $\gamma$ - weniger 20 pg/ml.

**[0024]** Das Denguevirus im Blut der Tiere wurde mittels RT-PCR identifiziert, so wie zuvor beschrieben (Harris et al.

J. Clin. Microbiol. 36, 2634-2639). Die Gesamt-RNA aus dem Blut wurde unter Verwendung eines Kits von Quiagen (Deutschland) isoliert. Die Primer waren wie folgt: oberer 5'AATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG (Position 136-161), unterer 5'AAGGAACGCCACCAAGGCCATG (Position 237-258), wobei sie ein 119 bp-Produkt amplifizierten. Um die Virusbelastung quantitativ zu bestimmen, wurde DEN-2 wie zuvor beschrieben auf Vero E6-Zellkulturen titriert (Harris et al. J. Clin. Microbiol. 36, 2634-2639). Am 0. und 22. Tag nach der Exposition wurde das Blut der überlebenden Mäuse mittels ELISA in Hinblick auf anti-DEN-2-Antikörper (IgG) analysiert, so wie zuvor beschrieben (Ignatyev et al. J. Biotechnology. 44, 111-118). Versuchsaufbau.

**[0025]** Durch Inzucht erzeugte, vier Wochen alte männliche BALB/c-Mäuse wurden in 6 Hauptgruppen aufgeteilt. Jede Gruppe enthielt 50 Mäuse. Alle Tiere wurden intraperitoneal (i.p.) mit dem an Mäuse angepassten DEN-2-Stamm P23085 (wie obenstehend beschrieben) in einer Dosierung von 1 LD<sub>50</sub> infiziert und täglich auf Anzeichen einer Krankhaftigkeit untersucht. Mäuse aus den ersten Untergruppen aller Hauptgruppen (A1-F1) wurden zur Mortalitätskontrolle herangezogen. Jede Untergruppe enthielt 20 Mäuse. Tiere der zweiten Untergruppen (A2 - F2) wurden zum Erhalten von Serumproben verwendet. Jede Untergruppe enthielt 30 Mäuse.

Gruppenbeschreibung. n= 50 in jeder Gruppe

Die Kontrollgruppe erhielt nur das Virus.

**[0026]** Die Behandlung mit Peptid B $\beta$ <sub>15-42</sub> wurde zweimal täglich mit jeweils 4800  $\mu$ g/kg durch eine intraperitoneale Injektion durchgeführt, und zwar ab dem 3. Tag nach der Infektion bis zum 8. Tag nach der Infektion.

Blut- und Serumproben wurden an den ausgewählten Zeitpunkten beschafft: am 1., 3., 5., 7., 11., 22. Tag nach der Exposition.

Eine statistische Analyse wurde unter Anwendung des Student's t- or Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als signifikant betrachtet.

Tabelle 1. Mortalität und IgG-Titer. p<0,05 zwischen Gruppen

Gruppe	Mortalität (%)	Überleben (%)	mittlere Zeitdauer bis zum Tod.	IgG-Titer
unbehandelt	40	60	6,800±0,245	1:160
B $\beta$ <sub>15-42</sub>	0	100	Alle Mäuse überlebten	1:20

Tabelle 2

	Kontrollen			B $\beta$ <sub>15-42</sub> -behandelt		
	Tag 3	5	7	Tag 3	5	7
Hämoglobin g/ml	14	10	10	15	10	15

Hämatokrit %	15	22	35	15	33	43
TNF pg/ml	33	71	65	32	65	45
IL-6 pg/ml	210	210	150	140	110	100
IL-1 pg/ml	32	55	59	32	29	28

## Virämie Ig PFU/ml

	Kontrollen	Bb <sub>15-42</sub>
Tag 0	0	0
2	1,2±0,1	1,2±0,2
3 <sup>b</sup>	2,4±0,3	2,2±0,2
4	4,4±0,2	4,2±0,2
5	6,0±0,4	5,6±0,4
6	6,2±0,4	6,0±0,4
7	6,3±0,3	5,9±0,4
28	0 -	0

## Gramnegativer Schock

**[0027]** Männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 230-280 g waren in der Tierversuchsanlage (Universität Düsseldorf) untergebracht und wurden mit Standardkost und Wasser *ad libitum* gefüttert. Alle Vorgänge wurden gemäß den AAALAC-Richtlinien und dem *Handbuch für die Pflege und Verwendung von Labortieren* (Amt für Gesundheit und Soziales, Nationale Gesundheitsinstitute, Veröffentlichung Nr. 86-23) ausgeführt. Außerdem waren alle Versuche von einer Behörde für Ethik und Forschung der Universität Düsseldorf und des Landes bewilligt. Wie zuvor beschrieben (Zacharowski et al. Crit Care Med 2000, Zacharowski et al. Crit Care Med 2001; 29:1599-1608), wurden die Ratten mit Natriumthiopenton (120 mg/kg i.p.) anästhesiert, und die Anästhesie wurde je nach Bedarf mit ergänzenden Dosierungen von Natriumthiopenton aufrechterhalten.

**[0028]** In die Luftröhre wurde eine Kanüle eingeführt, um die Atmung zu ermöglichen, und die rektale Temperatur wurde mit einer homöothermen Decke bei 37 °C gehalten. Die rechte Halsschlagader wurde katheterisiert und mit einem Druckfühler verbunden, um den phasischen und mittleren Arterienblutdruck (MAP) und die Pulszahl (HR) zu messen, welche auf einem Datenerfassungssystem (MacLab 8e, ADI Instruments, Deutschland) angezeigt wurden, das auf einem IBM-Computer installiert war. In die rechte Drosselvene wurde zur Verabreichung von Arzneimitteln eine Kanüle eingeführt. In die Blase wurde ebenfalls eine Kanüle eingeführt, um den Urinfluss zu ermöglichen und um die Möglichkeit der Entwicklung eines später auftretenden Nierenversagens zu verhindern. Alle Tiere erhielten während des gesamten Versuchs einen vollständigen Flüssigkeitsersatz von 1,0 ml/kg/h (0,9 % Natriumchlorid, Kochsalzlösung, als i.v.-Infusion in die Drosselvene). Nach Beendigung des chirurgischen Eingriffs wurde ermöglicht, dass sich die kardiovaskulären Parameter 15 Minuten lang stabilisierten, und sie wurden 6 Stunden lang ständig aufgezeichnet. Bei diesem Modell eines LPS-induzierten multiplen Organversagens ist ein Zeitraum von 6 Stunden wesentlich, um einen erheblichen Anstieg der Serumspiegel von AST und ALT zu erzielen, während ein erheblicher Anstieg der Serumspiegel von Harnstoff und Kreatinin bereits nach 2 Stunden beobachtet werden kann.

**[0029]** Drei Gruppen wurden untersucht:

Die Ratten wurden einer Scheinoperation unterzogen: (Simulation).

Die Ratten wurden einem gramnegativen Schock ausgesetzt. Lipopolysaccharid von *E. coli*, Serotyp 0,127:B8 (6 mg/kg i.v.), wurde 5 Minuten lang i.v. verabreicht, 1 Stunde später erhielten die Tiere eine Kochsalzlösung (2,4 ml/kg): (LPS + Kochsalzlösung).

Die Ratten wurden einem gramnegativen Schock ausgesetzt. Lipopolysaccharid von *E. coli*, Serotyp 0,127:B8 (6 mg/kg i.v.), wurde 5 Minuten lang i.v. verabreicht, die Tiere erhielten B $\beta$ <sub>15-42</sub> (2,4 mg/kg): (LPS + B $\beta$ <sub>15-42</sub>).

Überleben n=20 in jeder Gruppe, p<0,05

Simulation	LPS plus Kochsalzlösung	LPS plus B $\beta_{15-42}$
100 %	25%	88%

5

**[0030]** Sechs Stunden nach dem Auslösen eines gramnegativen Schocks wurde aus dem in der rechten Halsschlagader platzierten Katheter Blut entnommen. Die Blutprobe wurde zentrifugiert (1610 x g für 3 Minuten bei Raumtemperatur), um Plasma abzutrennen. Die folgenden Markerenzyme wurden im Plasma als biochemische Indikatoren für eine multiple Organschädigung/Fehlfunktion gemessen:

10

Eine Leberschädigung wurde bewertet, indem der Anstieg der Plasmaspiegel von Alaninaminotransferase (ALT, ein spezifischer Marker für eine Leberparenchymschädigung) und Aspartataminotransferase (AST, ein nicht spezifischer Marker für eine Leberschädigung) gemessen wurde.

15

Eine Nierenfunktionsbeeinträchtigung wurde abgeschätzt, indem die Anstiege der Plasmaspiegel von Harnstoff (ein Indikator für eine beeinträchtigte Ausscheidungsfunktion der Niere und/oder einen erhöhten Katabolismus) und Kreatinin (ein Indikator für eine reduzierte Glomerulusfiltrationsrate und folglich eine Nierenfunktionsbeeinträchtigung) gemessen wurden. Die Plasmaspiegel von Glucose und Amylase wurden als indirekte Marker der Pankreasfunktion und -schädigung gemessen.

Außerdem wurde das arterielle pO<sub>2</sub> als indirekter Marker der Lungenfunktion/-schädigung gemessen. Laborwerte

20

	Simulation	Kontrolle	B $\beta_{15-42}$
ALT	39,8	542,3	261,9
SEM	5,2	117,2	42,7
AST	194,1	908,8	529,0
SEM	30,8	140,9	75,7
Kreatinin	0,5	0,9	0,6
SEM	0,0	0,1	0,1
Harnstoff	49,1	123,2	107,8
SEM	5,8	4,6	5,9
Glucose	131,5	75,3	45,8
SEM	7,5	5,4	9,1
Amylase	1713,3	1837,4	1945,1
SEM	131,5	122,7	176,8
pO <sub>2</sub>	90,0	67,0	98,7
SEM	1,8	3,7	8,2

50

Mittlerer Arteriendruck

**[0031]**

55

# EP 1 691 827 B1

Zeit	Simulation		LPS		LPS + B $\beta_{15-42}$	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
0	120,9	5,5	118,9	5,4	128,9	5,2
1	111,5	10,6	90,7	5,5	83,7	4,6
2	113,2	7,3	100,2	5,1	102,3	4
3	116,4	5,4	90	7,4	103,2	4
4	108,7	8,9	81,1	7,9	101,2	3
5	104,1	9,6	60,1	10,8	97,1	5,4
6	104,1	9,6	34,1	7,7	107,7	9,6

Pulszahl

[0032]

Zeit	Simulation		LPS		LPS B $\beta_{15-42}$	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
0	482,2	17	457	18,1	436,9	6,4
1	461,7	12,1	511,2	27,4	484,8	18,6
2	488,1	13,6	523,3	27,3	484,1	10,3
3	506,6	26,6	518,5	24,9	509,8	12
4	488,9	17,4	516,7	32,1	516,7	13,4
5	470,4	13,9	515,5	26,1	533,7	30,7
6	443,7	0,7	530,1	27,7	541,6	24,4

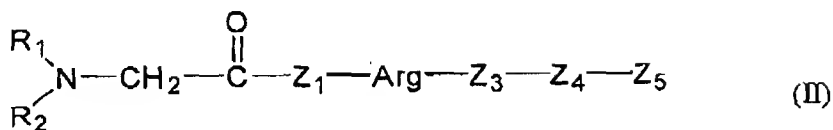
[0033] Am Ende des Versuchs wurden von allen untersuchten Gruppen Organ (Lunge, Leber, Herz und Niere)-Biopsien entnommen. Die Biopsien wurden bei Raumtemperatur in einer gepufferten Formaldehydlösung (4% in phosphatgepuffter Kochsalzlösung) fixiert und nach Wien versandt. Mit Standard-H&E gefärbte Abschnitte zeigten keinerlei Unterschiede. Bei Kontrollen, die nur LPS erhielten, fanden wir jedoch in Abschnitten, die unter Verwendung von saurem Fuchsin-Orange G hinsichtlich Fibrinablagerungen gefärbt wurden, Zahlen von Fibrinthrombi, die im Vergleich zu Tieren, welche mit LPS plus B $\beta_{15-42}$  ( $p < 0,05$ ) behandelt wurden, signifikant erhöht waren. In scheinbehandelten Tieren waren keine Fibrinthrombi vorhanden.

durchschnittliche Zahl von Fibrinthrombi in Gefäßen

	LPS plus Kochsalzlösung	LPS plus B $\beta_{15-42}$
Herz	28+13	5 + 2
Niere	17+8	2+9
Leber	47 + 41	78 + 37
Lunge	1,7+1 1	1 + 0

## Patentansprüche

1. Verwendung eines Peptids mit der allgemeinen Formel II



worin

$R_1$  und  $R_2$  gleich oder unterschiedlich, Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigte Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen bedeuten,  
 $Z_1$  einen Histidinrest bedeutet,  
 Arg einen Argininrest bedeutet,  
 $Z_3$  einen Prolin- oder Valinrest bedeutet,  
 $Z_4$  einen Leucin- oder Valinrest bedeutet,  
 $Z_5$  ein von der B $\beta$ -Kette des Fibrins abgeleiteter Peptidrest ist,  
 welches Peptid die biologische Eigenschaft besitzt, mit dem induzierbaren VE-Cadherin-Bindungsmotiv an der B $\beta$ -Kette (d.h. B $\beta_{15-42}$ ) des menschlichen Fibrins zusammenzupassen, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Behandlung von Schock.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin der gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffrest in der Bedeutung von  $R_1$  und  $R_2$  1 bis 3 Kohlenstoffatome aufweist.
3. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, daß**  $Z_5$  ein Peptidrest mit der Aminosäuresequenz

Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr  
 Arg

$Z_1$  ein Histidinrest,  
 Arg ein Argininrest,  
 $Z_3$  ein Prolinrest, und  
 $Z_4$  ein Leucinrest ist.

4. Verwendung eines Peptids, welches die N-terminale Sequenz

Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-  
 -Pro-Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg

aufweist, welches Peptid die biologische Eigenschaft besitzt, mit dem induzierbaren VE-Cadherin-Bindungsmotiv an der B $\beta$ -Kette (d.h. B $\beta_{15-42}$ ) des menschlichen Fibrins zusammenzupassen, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Behandlung von Schock.

5. Verwendung gemäß Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Peptid

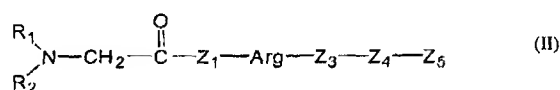
Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-  
-Pro-Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg

ist.

6. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Schock mit einem oder mehreren aus der Gruppe, umfassend Bakteriengifte, disseminierte intravaskuläre Koagulopathie, nekrotisierende Fasciitis, hämorrhagischen Schock infolge einer Virusinfektion, insbesondere verursacht durch Filovirus, Arenaviridae, Bunyaviridae, Flavivirus, Dengue, akutes hämorrhagisches Atmungsversagen, verursacht durch Infektionserreger oder Autoimmunerkrankungen, Organversagen nach einer Organschädigung, insbesondere durch einen Myocardinfarkt, eine Gefäßoperation, ein Abklemmen von Organen, einen hämorrhagischen Schock, Lungeninfarkt, Leberinfarkt, Darminfarkt, operative Eingriffe und Schlaganfall, und die Organfehlfunktion bei transplantierten Organen, in Zusammenhang steht.

### Claims

1. The use of a peptide of general Formula II



wherein

$R_1$  and  $R_2$ , being equal or different, denote hydrogen, a saturated or unsaturated hydrocarbon moiety comprising from 1 to 10 carbon atoms,  
 $Z_1$  denotes a histidine moiety,  
 Arg denotes an arginine moiety,  
 $Z_3$  denotes a proline or valine moiety,  
 $Z_4$  denotes a leucine or valine moiety,  
 $Z_5$  is a peptide moiety derived from the B $\beta$ -chain of the fibrin,  
 which peptide has the biological property of matching the inducible VE-cadherin binding motif on the B $\beta$ -chain (i.e. B $\beta$ <sub>15-42</sub>) of human fibrin, for the preparation of a pharmaceutical preparation for the treatment of shock.

2. The use according to claim 1, wherein the saturated or unsaturated hydrocarbon moiety in the meaning of  $R_1$  and  $R_2$  comprises from 1 to 3 carbon atoms.
3. The use according to any of claims 1 or 2, characterized in that  $Z_5$  is a peptide moiety comprising the amino acid sequence

Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr  
 Arg

$Z_1$  is a histidine moiety,  
 Arg is an arginine moiety,  
 $Z_3$  is a proline moiety, and  
 $Z_4$  is a leucine moiety.

4. The use of a peptide which exhibits the N-terminal sequence

Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-  
-Pro-Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg

5

which peptide has the biological property of matching the inducible VE-cadherin binding motif on the B $\beta$ -chain (i.e. B $\beta$ <sub>15-42</sub>) of human fibrin, for the preparation of a pharmaceutical preparation for the treatment of shock.

10

5. The use according to claim 4, **characterized in that** the peptide is

Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-  
-Pro-Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg.

15

20

6. The use according to any of claims 1 to 5, wherein shock is associated with one or more from the group comprising bacterial toxins, disseminated intravascular coagulopathy, necrotizing fasciitis, haemorrhagic shock following viral infection, in particular caused by filovirus, arenaviridae, bunyaviridae, flavivirus, dengue, acute hemorrhagic respiratory failure caused by infectious agents or autoimmune diseases, organ failure after organ injury, in particular myocardial infarction, vascular surgery, clamping of organs, haemorrhagic shock, lung infarction, liver infarction, gut infarction, surgical procedures and stroke, and organ dysfunction of grafted organs.

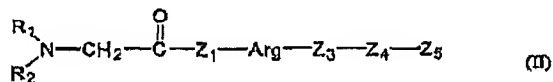
25

## Revendications

30

1. Utilisation d'un peptide de formule générale II

35



dans laquelle

40

R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné saturé ou insaturé ayant de 1 à 10 atomes de carbone,  
Z<sub>1</sub> représente un radical histidine,  
Arg représente un radical arginine,  
Z<sub>3</sub> représente un radical proline ou valine,  
Z<sub>4</sub> représente un radical leucine ou valine,  
Z<sub>5</sub> est un radical peptidique dérivé de la chaîne B bêta de la fibrine, lequel peptide possède la propriété biologique d'apparier la chaîne B bêta (à savoir B  $\beta$ <sub>15-42</sub>) de la fibrine humaine au motif de liaison VE-cadhérine inductible, pour la production d'une préparation pharmaceutique destinée au traitement du choc.

45

2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle le radical hydrocarboné saturé ou insaturé dans la signification de R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>, présente 1 à 3 atomes de carbone.

50

3. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, **caractérisée** à en ce que

Z<sub>5</sub> est un radical peptidique avec la séquence d'acides aminés

Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro  
Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg

55

Z<sub>1</sub> est un radical histidine,  
Arg est un radical arginine,  
Z<sub>3</sub> est un radical proline, et



Z<sub>4</sub> est un radical leucine.

4. Utilisation d'un peptide qui présente la séquence N-terminale

5

Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-  
Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-  
Tyr-Arg,

10

lequel peptide possède la propriété biologique d'apparier la chaîne B bêta (à savoir B  $\beta_{15-42}$ ) de la fibrine humaine au motif de liaison VE-cadhérine inductible, pour la production d'une préparation pharmaceutique destinée au traitement du choc.

5. Utilisation selon la revendication 4,

15

**caractérisée en ce que** le peptide est

Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg.

20

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle le choc est en relation avec l'un ou plusieurs du groupe comprenant les poisons bactériens, la coagulopathie intravasculaire disséminée, la fasciite nécrosante, le choc hémorragique à la suite d'une infection virale en particulier provoquée par les filovirus, les *Arenaviridae*, les *bunyaviridae*, les flavivirus, la dengue, l'insuffisance respiratoire hémorragique aiguë, provoquée par des agents infectieux ou des maladies auto-immunes, une insuffisance d'organe après une lésion organique, en particulier par un infarctus du myocarde, une intervention vasculaire, un sectionnement d'organes, un choc hémorragique, un infarctus pulmonaire, un infarctus hépatique, un infarctus intestinal, des interventions opératoires et un accident cérébro-vasculaire, et le dysfonctionnement d'organes dans le cas d'organes transplantés.

25

30

35

40

45

50

55

## IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

## In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- WO 0248180 A [0006] [0006] [0006] [0012]
- WO 9902565 A [0007]

## In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- Southan ; Szabo. *Biochem Pharmacol.*, 1996, vol. 51, 383-94 [0003]
- Thiemermann *Gen Pharmacol*, 1997, vol. 29, 159-66 [0003]
- Wray et al. *Shock*, 1998, vol. 9, 329-335 [0003]
- Altieri *Thromb Haemost*, vol. 82, 781-786 [0005]
- Herrick et al. *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 31, 741-46 [0005]
- Loike et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 88, 1044-48 [0005]
- van Gorp et al. *J Med Virol*, 2002, vol. 67, 549-54 [0007]
- Mairuhu et al. *Lancet Inf Dis*, 2003, vol. 3, 33-41 [0007]
- Idell. *Am J Respir Med.*, 2002, vol. 1, 383-91 [0007]
- Bunce et al. *J Clin Invest*, vol. 89, 842-50 [0013]
- Bach et al. *Exp Cell Res*, vol. 238, 324-34 [0013]
- Chalupowicz et al. *J Cell Biol*, vol. 130, 207-15 [0013]
- Hamaguchi et al. *Blood*, vol. 81, 2348-56 [0013]
- Francis et al. *Blood cells*, vol. 19, 291-306 [0013]
- Sporn et al. *Blood*, vol. 86, 1802-10 [0013]
- Ribes et al. *J Clin Invest*, vol. 79, 117-23 [0013]
- Ribes et al. *J Clin Invest*, vol. 84, 435-42 [0013]
- Erban ; Wagner. *J Biol Chem*, vol. 267, 2451-58 [0013]
- Qi et al. *Blood*, vol. 90, 3593-3602 [0013]
- Harley et al. *Art Thromb Vasc Biol*, vol. 20, 652-658 [0013] [0013]
- Martinez et al. *Ann NY Acad Sci*, vol. 936, 386-405 [0013]
- Bach et al. *J Biol Chem*, vol. 273, 30719-28 [0013]
- Biochemistry, vol. 41, 4107-16 [0013]
- Fareed et al. *Clin Chem*, vol. 8, 1845-53 [0013]
- Atrasheuskaya et al. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 35, 33-423 [0020]
- Harris et al. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, 2634-2639 [0024] [0024]
- Ignatyev et al. *J. Biotechnology*, vol. 44, 111-118 [0024]
- Zacharowski et al. *Crit Care Med*, 2000, vol. 29, 1599-1608 [0027]
- Zacharowski et al. *Crit Care Med*, 2001, vol. 29, 1599-1608 [0027]